

A-S4-27

TNF- α /HIF-1 α /VASP 途径在肺癌 A549 细胞增殖和粘附中的作用研究

吕佳蔚¹, 李群¹, 喻译锋², 罗振宇², 孙孔亮²; 指导教师: 魏蕾

1. 武汉大学 2010 级临床医学

2. 武汉大学 2012 级临床医学

【目的】 肺癌是目前世界癌症导致死亡排名第一的肿瘤, 其中肿瘤细胞的增殖和转移与肺癌的死亡率密切相关。最近的调查显示肿瘤坏死因子- α (TNF- α)与肿瘤的侵袭和转移相关, 但是具体的机制仍不清楚。本实验旨在以肺癌 A549 细胞作为模型, 研究 TNF- α /HIF-1 α /VASP 途径在肺癌 A549 细胞的增殖和粘附中的作用。

【方法】 常规培养 A549 细胞, 用 MTT 法和 adhesion assay 分别检测不同浓度的 TNF- α 对 A549 细胞增殖和粘附的影响。在随后的实验中采用高浓度的 TNF- α 刺激(120 ng/mL)作为刺激因素, 分别用 sh-RNA 和 pEGFP-C1-VASP 敲除或过表达 VASP、用 siRNA 和 pEGFP-C1 敲除或过表达 HIF-1 α , MTT 法和 adhesion assay 分别检测细胞增殖和粘附水平, PCR 检测 HIF-1 α 和 VASP 在 mRNA 表达水平, 蛋白质印迹法检测 HIF-1 α 和 VASP 蛋白的表达。同时采用 Luciferase assay 的方法检测 HIF-1 α 与 VASP 启动子区域结合的状态。

【结果】 (1)高剂量 TNF- α 可以促进 HIF-1 α 表达, 从而下调 VASP 表达水平, 抑制肺癌 A549 细胞增殖和粘附。(2)与空载质粒 pEGFP-C1 组相比, 瞬时转染 VASP 过表达质粒 pEGFP-C1-VASP 后, A549 细胞的增殖能力显著增加($P < 0.05$), 粘附能力显著增加($P < 0.05$)。相反, 与 Scrambled-shRNA 组比较, 通过转染 VASP shRNA 特异性敲降 VASP 后, A549 细胞的增殖能力显著降低($P < 0.05$), 粘附能力显著降低($P < 0.05$)。(3)选择高浓度 TNF- α (120 ng/mL)处理 A549 细胞 24 小时后, 与空载质粒 pEGFP-C1 组相比, 瞬时转染 HIF-1 α 过表达质粒 pEGFP-C1-HIF 后, HIF-1 α 的表达在 mRNA 和蛋白水平都显著增加($P < 0.05$), 与此同时 VASP 的表达在 mRNA 和蛋白的水平显著降低($P < 0.05$)。相反, 与 Scrambled-siRNA 组比较, 通过转染 HIF siRNA 特异性敲降 HIF-1 α 后, HIF-1 α 的表达在 mRNA 和蛋白水平都显著降低($P < 0.05$), 与此同时 VASP 的表达在 mRNA 和蛋白的水平显著增高($P < 0.05$)。(4)在给于肿瘤坏死因子- α 诱导的细胞中, 通过转染 HIF siRNA 特异性敲降 HIF-1 α 表达后, TNF- α 带来的 HIF-1 α 的升高被部分抵消了($P < 0.05$)。(5)Luciferase assay 的检测结果显示 HIF-1 α 可以与 VASP 启动子区域结合从而在转录水平上抑制 VASP 的表达。

【结论】 高浓度 TNF- α 通过增加 HIF-1 α 的表达, 调控并抑制 VASP 蛋白的表达, 从而降低肺癌 A549 细胞增殖和粘附, 从而发挥抗肿瘤的作用。

关键词: 肺癌; TNF- α ; HIF-1 α ; VASP; 肿瘤细胞增殖和粘附

A-S4-28

自分泌促炎因子在肿瘤化疗耐药中的作用

白震寰, 陈琼昀; 指导教师: 高丰光

厦门大学 2011 级临床医学

【目的】 顺铂和依托泊苷联合化疗(EP)是临床常用的针对肺癌的化疗方案。但长期应用 EP 后, 其药效减弱, 产生多药耐药, 影响疗效。并有文献报道, 某些促炎因子在多药耐药中发挥着作用。本课题旨在探究 EP 诱导的化疗耐药机制, 找出潜在的多药耐药作用靶点。

【方法】 (1)基础实验: 选用 NCI-H446 和 A549 肺癌细胞系, DDP 处理后进行细胞克隆形成实验, 发现在 CM 培养条件下, 两种细胞耐药性形成。以此为基础进行设计。用 TNF- α 、EP、CM、TNF- α 抑制剂分别或共同处理

H446 和 A549 细胞,通过光镜、流式细胞术、台盼蓝细胞计数来明确细胞存活情况。用 TNF- α 处理后通过蛋白质印迹和 real-time PCR 法检测 ABCG2、MRP2、Bcl-2、Bcl-xl、Mcl-1 的表达,再用 TNF- α siRNA 进行干扰,用 real-time PCR 检测。先用蛋白质印迹法检测两种细胞中磷酸化 ATM 和磷酸化 I κ B-a 的表达情况,再用 TNF- α 处理,通过蛋白质印迹和共聚焦显微检测,确定磷酸化 ATM、磷酸化 p65 和磷酸化 I κ B-a 的表达。用 TNF- α 、ATM 抑制剂、NF- κ B 抑制剂分别和(或)共同处理细胞,通过蛋白质印迹和 confocal 来确定磷酸化 ATM、磷酸化 p65、磷酸化 I κ B-a、ABCG2、MRP2、Bcl-2、Bcl-xl、Mcl-1 的表达。通过 siRNA 干扰 ATM、p65,再用蛋白质印迹和 real-time PCR 来确定这些蛋白的表达。(2)临床实验:通过回顾性分析,取小细胞肺癌和非小细胞肺癌患者的癌组织和癌旁组织,通过免疫组化检测 TNF- α 的表达情况。再结合患者的预后,进行数据分析,探究患者 TNF- α 表达和预后之间的关系。

【结果】 DDP 处理的细胞克隆实验发现,在 CM 培养条件下,NCI-H446 和 A549 两种细胞耐药性比 DDP 组明显,说明两种细胞耐药性形成。

【结论】 CM 中含有的某一细胞因子(TNF- α)能够诱导 NCI-H446 和 A549 两种肺癌细胞耐药性形成,为治疗肺癌多药耐药提供新的可能的治疗靶点。

关键词: TNF- α ; 肿瘤耐药; NCI-H446; A549

A-S4-29

PcG 调控肝癌耐药性的规律及机制研究

李康丽,赵 越,潘长宝;指导教师:高淑彬,金光辉

厦门大学 2011 级临床医学

【目的】 肝癌是目前我国发病率和致死率位居第二位的恶性肿瘤,每年约有 30 万例新发肝癌,占全球 50% 以上。尽管通过手术和化学药物治疗,其五年生存率仍然很低,肝癌细胞对于化疗药物的耐药性的产生是肝癌高致死率的主要原因。Polycomb group(PcG)蛋白通过染色质的组蛋白甲基化修饰调控靶基因的转录,是重要的促癌基因。我们及其他研究组发现,在肝细胞肝癌中 PcG 家族蛋白异常高表达,与肝癌术后存活率等恶性指标密切相关,是肝细胞肝癌预后的重要分子标志物。然而,PcG 蛋白在肝癌细胞耐药性的产生中如何发挥作用尚不清楚。本研究主要探讨 PcG 家族蛋白调控肝癌细胞化疗耐受性产生的生物学功能及其靶基因网络,并阐明其表观遗传学机制。

【方法】 用表柔比星、丝裂霉素 C 等化疗药物短期处理 HepG2 等肝癌细胞系,real-time qRT-PCR、蛋白质印迹检测 EZH2、SUZ12、CBX8 及 BMI1 等 PcG 家族蛋白表达规律;通过建立 EZH2 过表达或 shRNA 干扰稳定细胞系,克隆形成和流式细胞技术等检测细胞增殖、细胞凋亡等指标,探讨 EZH2 异常表达肝癌细胞对化疗药物的敏感性;从实验室前期 ChIP-on-ChIP 组学数据的整合性分析入手,筛选 ATM 等靶基因,探讨 PcG 调控 ATM 转录及表达的规律及机制,深入揭示 ATM 通路在 PcG 调控的肝癌细胞化疗药物耐受性产生中的关键作用。

【结果】 通过前期实验我们发现:短期化疗药物处理导致 PcG 蛋白表达量下降,而不影响其转录水平表达,提示化疗药物通过蛋白稳定性影响 PcG 蛋白表达;PcG 通过 H3K27me3 组蛋白甲基化机制抑制 DNA 损伤修复基因 ATM 表达,参与化疗药物引起的肝癌细胞 DNA 损伤修复过程,从而引起化疗药物耐受性产生;EZH2 蛋白的 SET 酶活性为靶点的小分子化合物 GSK126 显著促进肝癌细胞化疗药物敏感性。

【结论】 PcG 蛋白通过表观遗传学机制调控的 ATM 通路是肝癌细胞化疗耐受性产生的关键通路之一,以 PcG-ATM 为靶点的小分子化合物是有希望的化疗增敏剂。

关键词: PcG 蛋白; HCC; 耐药性